

**Untersuchungen zur Trennung der
menschlichen Serumlipoproteine mit Hilfe
der Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Michael Beltle

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553807_0053

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor Prof. Dr. W. Seitz

Untersuchungen zur Trennung der menschlichen Serumlipoproteine mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Beltle

aus

Ruhpolding

Jahr

1972

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Seitz

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. W. Kaiser

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 23. I. 1973



INHALTSVERZEICHNIS

I.	Abkürzungen	1
II.	Einleitung	2
	Grundlagen zur Beurteilung und Klassifizierung der Serumlipoproteine beim Menschen	
III.	Methoden zur Trennung der Serumlipoproteine	7
	1. Ultrazentrifugation	7
	2. Papierelektrophorese	8
	3. Agarose-Gelelektrophorese und Elektrophorese auf Celluloseacetat	8
	4. Andere Methoden	9
	5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	10
	Eigene Untersuchungen	
IV.	Methodik	11
V.	Ergebnisse und Diskussion	19
	1. Trennung der Serumlipoproteine an Polyacrylamid-Gel mit einheitlicher Porengröße	19
	2. Trennung der Serumlipoproteine an Polyacrylamid-Gel mit kontinuierlich steigender Porengröße, d.h. mit kontinuierlich steigendem Gelgradient	20
	3. Trennung der Serumlipoproteine mit Hilfe der Sephadex-Sandwich-Disk-Elektrophorese	22
	4. Trennung der Serumlipoproteine an Polyacrylamid-Gel mit diskontinuierlicher Porengröße, d.h. Stufengradienten-Gel	23
	5. Zur Färbung der Serumlipoproteine bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
	6. Plasmalipoproteine bei cholestatischem Ikterus	26
	7. Densitometrie der Lipoproteinfraktionen	27
VI.	Allgemeine Diskussion	28
VII.	Zusammenfassung	32
VIII.	Abbildungen	33
IX.	Literaturübersicht	36
X.	Lebenslauf	39

I. ABKÜRZUNGEN

α -Lipoproteine	HDL	high density lipoproteins ($d = 1,063 - 1,21$)
β - Lipoproteine	LDL	low density lipoproteins ($d = 1,006 - 1,063$)
prä- β -Lipoproteine	VLDL	very low density lipoproteins ($d = 1,006$)

Polyacrylamid-Gelelektrophorese	PAGE
kontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese	K-PAGE
diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese	D-PAGE
kontinuierliche Gradienten-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	KG-PAGE

N,N,N',N''-Tetramethylethyldiamin (Eastman Kodak Co)	TEMED
N,N'-Methylenbisacrylamid	Bis
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Tris

II. EINLEITUNG

Grundlagen zur Bedeutung und Klassifizierung der Serumlipoproteine beim Menschen

Die Ergebnisse auf dem Gebiet des menschlichen Lipidstoffwechsels haben in den letzten Jahren gezeigt, daß insbesondere den Serumlipoproteinen bei der Differenzierung verschiedener Lipidstoffwechselstörungen und in weiterem Zusammenhang damit deren pathophysiologischen Ursachen eine ganz bedeutende Rolle zukommt.

Das bedeutet, daß mit zunehmender Kenntnis des Lipidstoffwechsels und seiner verschiedenen Störungen der früher üblichen und allein möglichen Lipidanalyse des Plasmas in Form von Bestimmungen der Gesamtlipide, des Cholesterins, der Triglyceride und der Phospholipide eine immer begrenztere Aussagekraft zugebilligt werden muß.

So wurde auch die früher übliche Einteilung der menschlichen Hyperlipidämien (primäre oder familiäre bzw. sekundäre) aufgegeben zugunsten einer Klassifizierung der Lipidstoffwechselstörungen in Hyperlipoproteinämien; denn alle Hyperlipidämien gehen mit Konzentrationsänderungen und/oder -verschiebungen in der Protein-Lipidzusammensetzung der verschiedenen Plasma-lipoproteinfraktionen einher.

Die Fraktionierung und Klassifizierung der Plasmalipoproteine nach ihren physikalisch-chemischen, chemischen und immunologischen Eigenschaften hat zu wertvollen diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten bei den verschiedenen Hyperlipoproteinämieformen geführt.

Zur Klassifizierung der Plasmalipoproteine

Normalerweise sind in 100 ml menschlichem Serum etwa 0,5 g Lipide enthalten. Nur ein ganz geringer Teil davon könnte echt molekular gelöst sein. Schon sehr früh konnte gezeigt werden, daß die Lipide nicht-kovalent an Proteine gebunden im Serum transportiert werden, d.h. die Plasmalipoproteine transportieren die biologisch wichtigen Lipidverbindungen: Triglyceride, Phospholipide, Cholesterin und Cholesterinester.

Die Lipoproteine können zwar als Makromoleküle bezeichnet werden; sie sind jedoch keine Polymere. Der Lipidanteil ist durch nicht-kovalente Kräfte gebunden. Ihre Größe und Dichte ist abhängig von der Verfügbarkeit und dem chemischen Potential der umgebenden Lipide. So findet man eine Heterogenität in der Größe, der Dichte und dem Molekulargewicht dieser Makromoleküle. Durch ihre Protein-Lipid-Zusammensetzung sind also die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Serumlipoproteine bestimmt. Dabei hängt die Dichte vorwiegend von ihrem Neutralfettgehalt (Triglyceride und Cholesterinester) ab.

Dies führte zu Beginn der Forschung über die Serumlipoproteine zu einer Einteilung auf Grund des unterschiedlichen Sedimentationsverhaltens in verschiedenen Dichtebereichen bei der Ultrazentrifugation (3,4). Unter Verwendung der Ultrazentrifuge lassen sich die Serumlipoproteine in drei Gruppen fraktionieren:

1. VLDL (very low density lipoproteins, hierbei sind die Chylomikronen eingeschlossen), $d < 1,006 \text{ g/ml}$
 $S_f > 20$
2. LDL (low density lipoproteins), $d 1,006-1,063 \text{ g/ml}$
 $S_f 0-20$
3. HDL (high density lipoproteins), $d 1,063 - 1,21 \text{ g/ml}$

Die Quantifizierung der einzelnen Serumlipoproteinfraktionen mit Hilfe der Ultrazentrifuge ist zeitraubend und nicht für die Routinediagnostik geeignet. Deshalb wurden in den letzten Jahren elektrophoretische Methoden auf verschiedenen Trägermaterialien ausgearbeitet (siehe III). Hierbei ergibt sich - bei unterschiedlich guter Trennqualität - im wesentlichen eine Aufteilung in mindestens 4 Fraktionen:

1. Die nicht wandernden Chylomikronen
2. Die mit den β -Globulinen wandernden β -Lipoproteine
(entsprechend LDL)
3. Die Prae- β -Lipoproteine (entsprechend VLDL)
4. Die α -Lipoproteine mit einer Mobilität der α -Globuline
(entsprechend HDL)

Die Hyperlipidämien können nun in eines der von FREDRICKSON et al. (5) vorgeschlagenen Hyperlipoproteinmuster klassifiziert werden (Typ I bis Typ V). Da über die Ätiologie dieser verschiedenen Formen nicht allzuviel bekannt ist, beruht die Klassifizierung also heute auf der "Morphologie" des Serumlipoproteinmusters.

Eine dritte Klassifizierungsmöglichkeit der Plasmaproteine bezüglich ihres Apo-Lipoproteingehalts (Einordnung in 3 Fraktionen mit gleichen Apo-Lipoproteinen) erscheint für die klinische Diagnostik noch nicht verwendbar.

Die Lipoproteinkonzentrationen im menschlichem Serum

Untersuchungen an einer repräsentativen Zahl in der amerikanischen Bevölkerung zeigen statistisch signifikante Verhältnisse zwischen den mit einer ultrazentrifugischen Methode gewonnenen verschiedenen Lipoproteinspiegeln im Serum (4,8). Bei Männern ergaben sich dabei folgende Werte:

Chylomikronen:	12 ±	13 mg%
VLDL:	129 ±	122 mg%
LDL:	439 ±	99 mg%
HDL:	300 ±	83 mg%

Bei Frauen ergaben sich folgende Werte:

Chylomikronen:	2 ±	3 mg%
VLDL:	59 ±	63 mg%

LDL:	389 ± 79 mg%
HDL:	45 ± 115 mg%

Auffallend hierbei ist der deutliche Unterschied zwischen Männern und Frauen.

Auch eine Abhängigkeit der Serumlipoproteinkonzentrationen mit dem Alter konnte gefunden werden. So erhöht sich die LDL-Konzentration bei Männern und Frauen mit steigendem Alter, besonders deutlich in der 3. Lebensdekade (6). Erhöhungen in den VLDL-Konzentrationen mit dem Alter sind bei Männern deutlicher. Die Gründe für das Ansteigen dieser Fraktion mit dem Alter und ihre funktionelle Bedeutung sind noch nicht bekannt.

Es ist wahrscheinlich, daß im normalen menschlichen Serum noch mehrere unterschiedliche Lipoproteinklassen in ganz geringen Mengen vorhanden sind und erst bei bestimmten, genetisch bedingten Lipidstoffwechselstörungen in größeren Mengen auftreten und dann nachweisbar werden. Auch kann die Bedeutung einzelner Lipoproteine nicht allein auf Grund ihrer Serumkonzentration abgeschätzt werden.

III. METHODEN ZUR TRENNUNG DER SERUMLIPOPROTEINE

Die verschiedenen früheren Methoden zur Isolierung der Serumlipoproteine wurden erstmals 1968 von HATCH und LEES (8) in einer Übersicht zusammengefaßt.

Es gilt auch heute noch, daß die erfolgreichste und genaueste Trennung der Serumlipoproteine durch Ultrazentrifugierung des Serums in Lösungen mit steigender Dichte zu erreichen ist. Da die Lipide eine wesentlich geringere Dichte (0,88 - 1,06) als die Peptide (1,30 - 1,35) aufweisen, ist eine charakteristische Eigenschaft aller Serumlipoproteine ihre geringe Dichte. So können die Lipoproteine in der Ultrazentrifuge in Lösungen sedimentiert werden, die eine geringere Dichte als die der Lipoproteine aufweisen oder in Lösungen mit höherer Dichte flotiert werden. In der Praxis sind jedoch die gebräuchlichen Methoden für die präparative Isolierung der Serumlipoproteine mit Hilfe der Ultrazentrifugation sehr zeitraubend, mit hohem Arbeitsaufwand verbunden durch die wiederholten Zentrifugationen mit verschiedenen Lösungen unterschiedlichen Dichtegrads. Auch die Flotation der Lipoproteine in kontinuierlichem Dichtegradienten ist mit großem Zeitaufwand und verschiedenen technischen Schwierigkeiten verbunden (26) und gleichfalls nicht für die klinische Routinediagnostik geeignet. Aus diesen Gründen werden heute zur Auftrennung der Serumlipoproteine eine Reihe elektrophoretischer Methoden an ver-

schiedenen Trennmaterialien verwendet. Bei Verwendung der analytischen Ultrazentrifuge in der Untersuchung primärer hyperlipidämischer Krankheitsbilder konnten drei verschiedene Lipoproteinmuster identifiziert werden.

Papierelektrophorese

Von LEES und HATCH (12) wurde erstmals die Papierelektrophorese zur Trennung der verschiedenen Lipoproteinklassen verwendet. Mit dieser Methode wurde dann eine Klassifizierung der familiären Hyperlipidämien erarbeitet (5). Diese Methode war ein vielversprechendes und einfach anzuwendendes Verfahren, da die Chylomikronen an der Applikationsstelle des Serums absorbiert blieben, die VLDL-Lipoproteine in die Prä- β -Region, die LDL-Lipoproteine in die β -Region und die HDL-Lipoproteine in die α -Region wanderten.

Die Auftrennung auf Papier befriedigt weder in ihrem Auflösungsvermögen noch bezüglich ihrer quantitativen Auswertbarkeit.

Agarose-Gelelektrophorese und Elektrophorese auf Celluloseacetat

Als die Typisierung der Hyperlipoproteinämien allgemein üblicher wurde, untersuchten verschiedene Arbeitsgruppen die Trennung der Lipoproteine auf Agarose. Diese Technik der Elektrophorese und Lipoproteinfärbung geht etwas schneller, durch die Präparation der Agarosestreifen bringt sie jedoch gegenüber der

Papierelektrophorese keine Zeitersparnis. Gegenüber der Papierelektrophorese ermöglicht das Medium Agarosegel eine bessere Trennung der Prä- β -Bande von der β -Bande. Ein etwas besseres Trennergebnis wurde auch erreicht durch Hinzufügen von Albumin in das Agarosegel (27). Auch die Elektrophorese auf Celluloseacetat erbringt relativ deutliche Trennungen zwischen der Prä- β - und β -Bande, ohne Gegenwart von Albumin im Elektrodenpuffer (1). Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Abschätzung der relativen Größe der verschiedenen Banden durch Transmissions-Mikrodensitometrie.

Andere Methoden

Zur Isolierung und Charakterisierung der Serumlipoproteine wurden anfänglich auch Verfahren mit Aussalzen der Lipoproteine oder durch Unterscheidung in der Löslichkeit (mit Zinkreagenzien (13) oder im Äthanol-Wasser-System bei niedriger Temperatur (21) verwendet. Bestimmte Polyanionen mit hohem Molekulargewicht präzipitieren LDL und HDL ziemlich spezifisch; in Gebrauch sind mit wechselnd gutem Erfolg Heparin, Dextransulfate, sulfatiertes Amylopectin und andere sulfatierte Kohlenhydrate. Auch Säulenchromatographie und Gelfiltration wurde zur Lipoproteinreinigung mit einigem Erfolg verwendet (8).

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durch die Polymerisation von wässrigen Acrylamidlösungen können Gele hergestellt werden, die für die elektrophoretische Trennung und Quantifizierung vor allem von Proteinen viele Vorteile brachten. Ihre homogene Transparenz, die kontrollierbare und reproduzierbare Porosität, das Fehlen elektroosmotischer und sonstiger aktiver Effekte sind Bedingungen für ausgezeichnete Definitionen. Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgt nicht nur eine Auftrennung nach der Ladung der zu trennenden Substanzen, sondern auch ein Aussieben nach ihrer Molekülgröße und Gestalt. Damit beruht die Trennung auf der Kombination zweier Trennprinzipien: der elektrophoretischen Beweglichkeit und des Molekularsiebeffekts. NARAYAN et al. (16,17) zeigten 1965 erstmals, daß die von ORNSTEIN (22) für die Proteintrennung eingeführte Polyacrylamid-Gelelektrophorese auch zur Trennung von Serumlipoproteinen der Ratte geeignet war.

Eigene Untersuchungen

IV. METHODIK

Patientenmaterial und Serumproben

Alle Blutproben wurden von Personen gewonnen, die unter Normalkost standen und mindestens 12 - 16 Stunden gefastet hatten. Die Normalpersonen hatten anamnestisch, klinisch und laborchemisch keine Hinweise auf eine symptomatische oder primäre Hyperlipoproteinämie. Die mittlere Gesamtcholesterinkonzentration im Serum betrug 205 ± 25 mg%.

Patienten mit Hinweisen auf eine wahrscheinliche Hyperlipoproteinämie wurden auf Grund ihrer familiären, klinischen und lipidchemischen Daten, vereinzelt durch Kenntnis der einzelnen Serumlipoproteinfraktionen bzw. -erhöhungen in der Agarose-Gelelektrophorese, sorgfältig ausgesucht.

Alle Blutproben wurden sofort bei 2000 rpm 15 - 20 Minuten zentrifugiert. Die Serumproben wurden bis zur elektrophoretischen Trennung etwa 24 Stunden, maximal bis 48 Stunden bei 4° C aufbewahrt.

Substanzen und verwendete Apparatur

- I. Reagenzien: Polyacrylamid in Substanz $F_p = 84^\circ - 86^\circ$
Bis = N,N'-Methylenbisacrylamid
Kaliumferricyanid
Tris = Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Temed = N,N,N',N'-Tetramethyläthyldiamin
1 n HCl (20 ml konz. HCl + 222 ml aqua dest.)
Riboflavin
Glycin in Substanz
Sudanschwarz 10 B (Merck)
Aethylenglycol für Chromatographie (Merck)
Siliconlösung (Fa. Serva)
- II. Geräte: Glassäulen: Länge ca 14 cm
Durchmesser 5 mm
Glasdicke 1 mm
Elektrophoresekammer mit Wasserkühlung
(siehe Abbildung 1) Herstellung nach eigenen
Angaben
UV-Lampe
Wasserstrahlpumpe
Pipette (1 ml) mit Verlängerungsschlauch aus
Plastik
Densitometer

III. Herstellung der Lösungen

Lösung 1: 9,5 %ige Polyacrylamidlösung enthält:

19 g Acrylamid
0,57 g Bis
0,0075 g Kaliumferricyanid ad 50 ml aqua dest

Lösung 2: 3,75 %ige Polyacrylamidlösung enthält:

7,5 g Acrylamid
0,225 g Bis
0,0075 Kaliumferricyanid ad 50 ml aqua dest

Lösung 3: 3,6 %ige Polyacrylamidlösung enthält:

7,2 g Acrylamid
0,216 g Bis
0,0075 g Kaliumferricyanid ad 50 ml aqua dest

Lösung 1 - 3 gelten als Untergellösung

Lösung 4: Obergellösung (d) enthält:

5,5 g Acrylamid
1,25 g Bis ad 50 ml aqua dest

Lösung 5: Untergelpuffer pH 8,8 enthält:

ca 29 g Tris
0,47 Temed
48 ml 1 n HCl ad 100 ml aqua dest
(Exakte pH-Einstellung erfolgt mit dem pH-Meter
und durch Zugabe von Tris bei konstanter
Temperatur von 20 ° C)

Lösung 6: Obergelpuffer pH 6,9 enthält:

ca 5,6 g Tris
0,4 Temed
48 ml 1 n HCl ad 100 ml aqua dest (pH-Ein-
stellung siehe Lösung 5)

Lösung 7: Riboflavin als Katalysator für die Polymerisation

4 mg Riboflavin ad 100 ml aqua dest

Lösung 8: Elektrodenpuffer pH 8,9 enthält:

28,8 g Glycin in Substanz

6,0 g Tris ad 100 ml aqua dest

Zur Elektrophorese 1 : 3 verdünnen

Lösung 9: Sudanschwarzlösung

0,5 g Sudanschwarz

9 ml Aethylenglycol

Nach vollständiger Lösung filtrieren (s. Literatur 24)

Lösung 10: Eingefärbtes Serum

Zu 0,5 ml Serum gibt man 0,175 ml von der standardisierten Sudanschwarzlösung. Gut mischen lassen auf einem Rotationsmischer (ca 15 Min.).

Arbeitsvorgang

Vorbereitung der Glassäulen

Zuerst werden die sauberen Glassäulen siliconisiert. Dazu spült man die Glassäulen mit Siliconlösung durch. Anschließend trocknet man sie im Sterilisator 1 Stunde bei 100° C. Nach ca 10maligem Gebrauch müssen die Säulen jeweils neu siliconisiert werden. Die siliconisierten Glassäulen werden nun mit Parafilm an einer Seite fest verschlossen. Dann stellt man die Säulen in einen dafür hergerichteten Ständer, wobei das Gestell des Ständers keinen Schatten auf den Bereich der zu polymerisierenden Säulen werfen darf (während der UV-Be-strahlung).

Herstellung der Gelsäulen

Die Gelsäule besteht aus drei Untergelschichten und einer Obergelschicht. Man gibt nun in vier Bechergläser die verschiedenen Gelansätze, mit Ausnahme der Lösung 7 (Riboflavin). Diese darf jeweils erst kurz vor dem Einfüllen in die Säulen hinzugegeben werden, da sonst eine zu schnelle Polymerisation erfolgt.

Zusammensetzung der Gelkonzentrationen:

Untergellösung $c_1 = 9,5 \text{ \%ig}$

1 Teil	1 a (Untergelpuffer pH 8,8)
2 Teile	1 c_1 (Lösung 1)
4 Teile	aqua dest
1 Teil	1 e (Riboflavin)

Untergellösung $c_2 = 3,75 \text{ \%ig}$ Ansatz siehe Untergellösung c_1

Untergellösung $c_3 = 3,60 \text{ \%ig}$ Ansatz siehe oben

Obergellösung d	1 Teil	1 b (Obergelpuffer pH 6,9)
	1,5 Teile	1 d (Lösung 4)
	4 Teile	aqua dest
	1 Teil	1 e (Riboflavin)

Die Ansätze mischt man gut durch, ohne Luftblasen in der Lösung zu erzeugen. Sie dürfen nicht im UV-Bereich stehen, da sonst schon die Polymerisation erfolgt.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese an Gel von einheitlicher Porengröße

Zur Bereitung des Gels werden in das Glasröhrchen zuerst 1,3 ml

Untergellösung (3,75 % bzw. 4,5 %) gebracht, anschließend vorsichtig mit H_2O überschichtet. Die Glasröhrchen werden bis zur Polymerisation des Gels ca 1 Stunde mit einer UV-Lampe bestrahlt. Nach vollständiger Polymerisation wird das überstehende H_2O vorsichtig abgesaugt und die Obergellösung (0,25 ml) über das Untergel geschichtet und wiederum mit der UV-Lampe polymerisiert. Zur kompletten und einheitlichen Polymerisation läßt man die Röhrchen anschließend mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen.

Polyacrylamid-Gel mit kontinuierlichem Gelgradienten

Zur Bereitung eines Gels mit kontinuierlichem Gel-Gradienten zwischen 8,0 und 3,0 % Polyacrylamid werden in einem eigens hierfür konstruiertem Gradientenmischgerät die beiden Lösungen (unten 8,0 %, 0,7 ml und oben 3,0 %, 0,7 ml) vorsichtig im Dunkeln (zur Vermeidung einer vorzeitigen Polymerisation) unter ständigem Rühren in der Mischkammer in das Röhrchen gemischt. Nach der Polymerisation dieses Gels wird wiederum 0,25 ml Obergellösung darüber polymerisiert

Elektrophorese

Die einzelnen Gelröhrchen werden nun vorsichtig in die Elektrophoresekammer gebracht. Die Abdichtung der Elektrophoresekammer

von der Kühlkammer erfolgt durch Gummidichtung. Nach Einbringen des Elektrodenpuffers in die beiden Kammern und Anschluß des Kühlsystems wird das Stromversorgungsgerät eingeschaltet (140 V, 8 mA für 8 Röhrchen). Die Laufzeit beträgt ca 2 Stunden.

Die Auswertung erfolgt durch Densitometrie der mit Sudanschwarz gefärbten Lipoproteinbanden bei 590 nM.

Sephadex-Sandwich-Disk-Elektrophorese (vgl. Abb. 2)

In den Gelröhrchen werden zuerst 0,5 ml 6,0 % Untergellösung polymerisiert. Anschließend wird in Untergelpuffer gelöstes Sephadex-G 200 (bzw. Bio-Gel A 0,5 m bis A 1,5 m) überschichtet. Zur Erhöhung der Viskosität wird dem Untergelpuffer Saccharose (20 %) zugefügt. Die Sephadex-G 200-Säule entspricht dabei nach vollständiger Sedimentation einem Volumen von 0,3 ml. Über diese Säule wird nun eine 3,6 %ige Untergellösung (0,4 ml) polymerisiert, zuletzt wiederum ein Obergel (0,25 ml).

Stufengradienten-Gel (s. Abb. 2)

Die Glasröhrchen werden mit den verschiedenen Polyacrylamid-Konzentrationen gefüllt, d.h. nach vollständiger Polymerisation des untersten Gels werden schrittweise die nächsten Gelkonzentrationen einpolymerisiert.

Auftragen des Serums zur Elektrophorese

Zur vollständigen Anfärbung der einzelnen Lipoproteinbanden mit Sudanschwarz 10 B muß mindestens 12 Stunden vorgefärbt werden. Zur Elektrophorese werden 0,035 ml aufgetragen. Zur Vermeidung einer Mischung wird vorsichtig mit Elektrodenpuffer überschichtet.

Färbung der Lipoproteine mit Lipid Crimson

3 g Lipid Crimson (s. dazu 15) werden in 600 ml 95 % Äthanol gelöst, nach Zufügen von 400 ml Wasser bleibt diese Lösung bis zur Verwendung 1 Woche stehen und wird dann filtriert. Die Gele werden 2 Stunden bei 65° C gefärbt, anschließend 12 Stunden bei Raumtemperatur in der Färbelösung stehen gelassen. Entfärbt wird mit 10 % Eisessig unter mehrfachem Wechsel der Entfärbelösung.

V. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Alle im Gebrauch befindlichen Trägermaterialien wie Papier, Cellulose-acetat, Agarose-Gel, Stärke-Gel und Polyacrylamid-Gel weisen bestimmte charakteristische Eigenschaften in Bezug auf ihr Trennvermögen für Serumlipoproteine auf.

Durch die verschiedenen Variationen der Polyacrylamid-Gelelektrophorese versuchten wir alle Möglichkeiten auszuschöpfen, die mit dieser Methode für eine Trennung der verschiedenen Serumlipoproteine gegeben sind.

Trennung der Serumlipoproteine an Polyacrylamid-Gel mit einheitlicher Porengröße

Hierzu verwendeten wir in unseren Untersuchungen Gele mit Polyacrylamid-Konzentrationen im Trenngel zwischen 3,5 - 4,75 %. Die günstigsten Ergebnisse wurden mit einer Konzentration von 3,75 % erreicht. Es ergab sich keine Schwierigkeit in der Trennung von Chylomikronen und den anderen Lipoproteinen, da die Chylomikronen zusammen mit dem überschüssigem Sudan-schwarz am Start liegenbleiben. Auch die HDL-Fraktion (α -Lipoproteine) ist hier deutlich abgrenzbar. Während bei Normalpersonen die Trennung von Prä- β und β -Lipoproteinen deutlich

ist, sind die Verhältnisse bei pathologischen Lipoproteinkonzentrationen (insbesondere bei Typ III-, Typ II- und Typ IV-Hyperlipoproteinämie) nicht so günstig zu beurteilen.

Vorteil dieser PAGE gegenüber der Papier- und Agar-Gelelektrophorese ist jedoch eine semiquantitative Aussage durch die Möglichkeit der Densitometrie. Über die Aussagefähigkeit der Sudanschwarzfärbung in Relation zum Lipoproteingehalt soll jedoch später diskutiert werden.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese in kontinuierlichem Gelgradienten

Mit Sudanschwarz B vorgefärbtes Serum von Normalpersonen und Patienten mit verschiedenen Hyperlipoproteinämien wurde zur Gelelektrophorese auf Polyacrylamid-Gelröhrchen aufgetragen. Diese Gele zeigten (wie bereits in der Methodik "Polyacrylamid-Gel mit kontinuierlichem Gelgradienten" beschrieben, in der Polyacrylamidgelkonzentration verschiedene kontinuierliche Gradienten zwischen minimal 3,0 % und 3,4 % (kathodenwärts) nach dem Sammelgel und maximal 6 - 8 % (anodenwärts) Polyacrylamidgel, bei einer Länge des Trenngels von 6 - 7 cm.

Bei der Auftrennung der Serumlipoproteine mit dieser Methode konnten bei sorgfältigster Bereitung der Gele sehr gute Trennergebnisse der verschiedenen Serumlipoproteinfractionen er-

zielt werden. Im Bereich der LDL-Lipoproteine kam es bei Normalpersonen zur Auftrennung von 3 bis sogar 4 Unterfraktionen, bei Patienten mit cholestatischem Ikterus schien eine dieser Unterfraktionen deutlicher aufzutreten. Trotz sorgfältigster Bereitung der Gelgradienten war jedoch keine vollständige Reproduzierbarkeit zu erreichen. Als Gründe hierfür nehmen wir eine etwas variable Polymerisation des Gels an. Bei der Bereitung des Gradienten in Gelröhrchen mußte langsam übereinander geschichtet werden, um ein Mischen des Gelgradienten zu vermeiden. Dies erforderte gleichzeitig, daß die Polymerisationszeit verlängert wurde, dies wiederum ist der wahrscheinliche Grund für eine inhomogene Polymerisation und variable Porengröße des Gels mit vereinzelt "Gelsprüngen".

Eine sehr gute Auflösung der mit Sudanschwarz gefärbten Serumlipoproteinfraktionen erscheint hier möglich, eine vollkommene Reproduzierbarkeit ist jedoch unter unseren Bedingungen nur teilweise möglich; für Routinediagnostik ist diese Methode nicht geeignet.

Mit konvexen oder konkaven Gelgradienten (in der Porengröße kontinuierlich steigend, jedoch nicht geradlinig) war das Auflösungsvermögen nicht wesentlich zu verbessern; die nicht optimale Reproduzierbarkeit spricht auch hier gegen eine breitere Anwendung.

Trennung der Serumlipoproteine mit Hilfe der Sephadex-Sandwich-Disk-Elektrophorese

Zur Auftrennung eines löslichen Lipoproteins aus Rattenleber-mitochondrien beschrieben KOPPIKAR et al. (11) ein System, bei dem Polyacrylamidgel und Sephadex-G-200 als Trägermaterial für die Disk-Elektrophorese kombiniert wurde. Dabei wird zwischen zwei Polyacrylamid-Trenngelen eine Schicht Sephadex-G-200 gegossen.

Zu unseren Untersuchungen mit diesem System verwendeten wir verschiedene Trenngel-Konzentrationen, unterschiedliche Längen der Polyacrylamid-Gelsäulen und der Sephadex-G-200 Säule sowie verschiedene pH-Bereiche im Puffer des Sephadex-G-200-Sandwich. Wesentliche Vorteile in der Fraktionierung der verschiedenen Serumlipoproteine gegenüber der Trennung an diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelen ergaben sich aber dabei bei keinem der verschiedenen Systeme. Ein möglicher Anwendungsbereich für diese Methode bei der Isolierung und raschen sowie störungsfreien weiteren Analyse der verschiedenen Serumlipoproteinfraktionen scheint jedoch gegeben; die in das Sephadex-Sandwich eingewanderte Serumlipoproteinfraktion kann nämlich zur weiteren Analyse besser weiterverarbeitet werden, wogegen die quantitative Extraktion und störungsfreie Analyse aus dem Polyacrylamid-Gel wesentlich schwieriger ist.

Trennung der Serumlipoproteine an Polyacrylamid-Gel mit diskontinuierlicher Porengröße, d.h. Stufengradienten-Gel

Nachdem sich an der Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit kontinuierlichem Gelgradienten zwar ein sehr gutes Auflösungsvermögen der einzelnen Lipoproteinfraktionen gezeigt hatte, diese Trennung durch die mangelhafte Reproduzierbarkeit eines homogen polymerisierten Gels jedoch aus technischen Gründen keine Methode für größere Serienbestimmungen werden konnte, schätzten wir aus diesen Untersuchungen die Polyacrylamidkonzentration ab, in denen es zur optimalen Trennung der verschiedenen Serumlipoproteine kam.

Durch Aufeinanderichten der verschiedensten Gelkonzentrationen suchten wir die für eine Trennung vor allem der β - und Prä- β -Banden günstigsten Bedingungen (s. Abb. 2). Die hohe Trennschärfe der verschiedenen Lipoproteinfraktionen wird hier vor allem dadurch erreicht, daß die Lipoproteine an dem diskontinuierlichen Gelgradienten mit unterschiedlicher Porengröße vor allem durch den Molekularsiebeffekt verschieden stark zurückgehalten werden.

Mit dieser Methode erreichten wir unter unseren Bedingungen eine sichere und deutliche Auftrennung der Serumlipoproteine in mindestens 4 Banden. Die Chylomikronen bleiben am Start liegen. Die Prä- β -Lipoproteine (sie wandern im Gegensatz zur Papier-, Agar-Gel- und Celluloseacetat-Elektrophorese bei der PAGE langsamer als die β -Lipoproteine) durchwandern das

Obergel gerade noch, sammeln sich aber im oberen Teil des 3,6 %igen Trenngels an, während die β -Lipoproteine bis zum unteren Teil dieses Trenngels wandern. Die β -Lipoproteine zeigen dabei bei verschiedenen Krankheitsbildern (z.B. cholestatischer Ikterus) eine weitere Auflösung in 2 - 3 Fraktionen. Bei der Typ III-Hyperlipoproteinämie kommt es zu keiner deutlichen Trennung der β - von der Prä- β -Bande; diese Serumlipoproteine zeigen eine breite β -Bande mit kontinuierlicher Zunahme von der Prä- β - zur β -Region. Die α -Lipoproteine sammeln sich im 9,5 %igen Gel in 2 Banden; davon getrennt ist die Albuminfraktion. Untersucht man die in der Ultrazentrifuge gewonnenen, verschiedenen Serumlipoproteinfraktionen (nach Dialyse gegen physiologische NaCl-Lösung) unter unseren elektrophoretischen Bedingungen, so zeigen sie das gleiche elektrophoretische Verhalten wie die Fraktionen, die beim Auftragen des Serums erhalten wurden.

Zur Färbung der Serumlipoproteine bei der Polyacrylamid-Gel-elektrophorese

Färbung mit Sudanschwarz

Die Serumlipoproteinmuster zeigen qualitativ und in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit keinen wesentlichen Unterschied zwischen vergleichbaren Seren, die mit Sudanschwarz B vor der elektrophoretischen Trennung vorgefärbt waren und jenen Mustern, die erhalten wurden, wenn die Gele nach der elektro-

phoretischen Trennung der Serumlipoproteine mit Sudanschwarz gefärbt wurden. Nachteil der letzteren Methode ist jedoch ein längerer Zeitaufwand und ein nicht vollständig reproduzierbares Quellen bzw. Schrumpfen der Gele in der Entfärbelösung, so daß eine systematische densitometrische Auswertung nicht möglich ist.

Als ein weiterer Vorteil der Vorfärbung der Serumlipoproteine mit Sudanschwarz ist die Möglichkeit, die elektrophoretische Trennung der einzelnen Fraktionen während der Untersuchung beobachten zu können. Eine Klassifizierung in die verschiedenen Hyperlipoproteinämie-Formen wäre somit durch Inspektion sofort möglich.

Färbung mit Lipid Crimson

Bei der Färbung der verschiedenen Lipoproteinfraktionen mit Lipid Crimson erhält man im Vergleich zur Sudanschwarz-Färbung vergleichbares Färbeverhalten der Serumlipoproteine. Diese Färbemethode ergibt somit keine Vorteile für die Untersuchung der Serumlipoproteine. Der Vorteil der Sudanschwarz-Färbung liegt darin, daß das Serum vor der Elektrophorese angefärbt werden kann, die elektrophoretische Trennung kann laufend beobachtet werden.

Färbung der Lipoproteine mit Oil Red O

Das Lipoproteinmuster zeigte bei diesen beiden Färbungen keine wesentlichen Unterschiede zum Färbeverhalten mit Sudan-schwarz B.

Plasmalipoproteine bei cholestatischem Ikterus

Die Untersuchungen von SEIDEL et al. (25) zeigen, daß das Serum-lipoproteinmuster bei Patienten mit cholestatischem Ikterus charakterisiert ist durch:

1. eine verminderte HDL-Konzentration
2. eine erhöhte LDL-Konzentration
3. durch den Nachweis eines spezifischen Lipoproteins
LP-X in der LDL-Fraktion

Bei zwei Patienten mit cholestatischem Ikterus konnten wir sowohl bei der elektrophoretischen Trennung an Polyacrylamid-Gel mit kontinuierlichem Gelgradienten als auch an Stufengradienten-Gel eine von der LDL(β)-Fraktion deutlich abgesetzte Lipoproteinfraktion nachweisen. Das LP-X wäre somit auch bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter unseren Bedingungen nachweisbar.

Densitometrie der Lipoproteinfraktionen

Eine photometrische Auswertung der einzelnen mit Sudanschwarz gefärbten Lipoproteinfraktionen ist grundsätzlich möglich, da Acrylamid-Gel durchsichtig ist. Es war dazu nicht nötig, die Gelsäulen aus dem Röhrchen zu nehmen. Densitometrie mit dem Vitatron-Gerät (590 nm) führt zu Angaben über die Relativ-Prozente der einzelnen Fraktionen.

VI. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Die Klassifizierung der Hyperlipoproteinämien beruht auf Informationen, die mit der Papierelektrophorese und der Lipidfärbung des Lipoproteinkomplexes erhalten wurden (5,8). Es wurden seitdem verschiedene andere elektrophoretische Methoden entwickelt mit dem Ziel, den Zeitaufwand bei der Elektrophorese und der Färbung herabzusetzen (16 - 21 Stunden), das Trennvermögen zu verbessern, die direkte densitometrische Quantifizierung der Lipoproteinfraktionen zu erreichen. Verschiedene Trägermedien erfüllen einige der erwünschten Kriterien.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigt in der Protein-, Hämoglobin- und Isoenzymfraktionierung ein außerordentlich gutes Trennvermögen durch Kombination eines Molekularsiebeffektes und eines Konzentrierungseffektes bei diskontinuierlichem Puffersystem.

Als erste verwendeten NARAYAN et al. (16) diese Methode zur Fraktionierung von Lipoproteinen im Serum von Ratten. Seitdem wurde über verschiedene Untersuchungen berichtet, in denen Serumlipoproteine mit Hilfe der elektrophoretischen Trennung an Polyacrylamid-Gel einheitlicher Gelkonzentration fraktioniert werden konnten (11, 18, 23).

Bei den bisherigen Untersuchungen wurden die Lipoproteine an Polyacrylamid-Gel einheitlicher Porengröße fraktioniert. Dabei

schien gegenüber den bisher üblichen Methoden das Auflösungsvermögen der 4 Haupt-Lipoproteinfraktionen günstiger zu sein; das durchsichtige Gel begünstigte eine densitometrische Auswertung der gefärbten Lipoproteinbanden.

Es sollte nun in diesen Untersuchungen versucht werden, unter Einsatz aller möglichen Variationen in der Bereitung von Polyacrylamid-Gelsäulen optimale und reproduzierbare Bedingungen für eine quantitative Bestimmung der menschlichen Serumlipoproteinfraktionen zu erreichen.

Mit Polyacrylamid-Gel einheitlicher Porengröße war es uns (in den verschiedenen Konzentrationen zwischen 3,2 - 4,75 %) nicht in allen Fällen - und insbesondere nicht bei pathologischen β -Lipoproteinerhöhungen - möglich, eine eindeutige Trennung der Prä- β -Lipoproteine von den β -Lipoproteinen zu erreichen. Durch Elektrophorese in Gelsäulen, bei denen die Konzentration an Polyacrylamid von oben nach unten linear, konkav oder konvex anstieg, konnte eine wesentliche Besserung im Auflösungsvermögen aller Lipoproteinfraktionen erzielt werden; die Prä- β -Fraktion war auch bei pathologischen Seren in jedem Fall von der β -Fraktion gehemmt; zusätzlich zeigten sich in der β -Fraktion z.T. 2 - 3 zusätzliche und deutlich abgesetzte Banden. Die Bereitung solcher kontinuierlicher Gradienten-Gele ist jedoch zeitlich sehr aufwendig, ein immer reproduzierbares, einheitliches bzw. homogenes Gel war auch bei größter Sorgfalt nicht zu erzielen. Eine Routineanwendung dieser Methode scheint

uns nicht gegeben. Mit der Sephadex-Sandwich-Disk-Elektrophorese erreicht man eine gute Fraktionierung der Serumlipoproteine; Vorteile gegenüber der Stufen-Gradienten-Gelelektrophorese sind jedoch z.Zt. kaum gegeben.

Aus den bei der kontinuierlichen Gradienten-Gelelektrophorese gewonnenen Erkenntnissen stellten wir Polyacrylamid-Gelsäulen mit vier übereinander geschichteten in der Polyacrylamid-Konzentration unterschiedlichen Gelen zusammen. Bei Auswertung der verschiedensten Säulen zeigten sich (sowohl was Konzentration und Dimension anbelangt) die in Abb. 2 c angegebenen Verhältnisse als die günstigsten. Bei dieser Methode kam es in jedem Falle, also auch bei stark erhöhten β -Lipoproteinkonzentrationen im Serum, zu einer klaren Trennung zwischen β -Lipoproteinen und Prä- β -Lipoproteinen. Im Gegensatz zu den bisher üblichen elektrophoretischen Trennmethoden auf anderen Trägermedien ist das "floating- β " bei der Typ III-Hyperlipoproteinämie bei unserer Methode klar als solches zu erkennen und erlaubt die Diagnose ohne Einschaltung der Ultrazentrifuge. Wiederholte Untersuchung eines Serums ergab ein charakteristisches und reproduzierbares Lipoproteinmuster. Der reine Zeitaufwand für die Präparation dieser Gelsäulen ist gering (16 Röhrchen in etwa 2 Stunden). Die Elektrophorese dauert 2 Stunden. Ein großer Vorteil ist, daß der Trennvorgang während der Elektrophorese durch die Vorfärbung des Gels direkt beobachtet werden kann, anschließend eine Densitometrie der Lipoproteinfraktionen ohne weiteren Auf-

wand direkt in den Glasröhrchen angeschlossen werden kann.

Alle bisherigen Methoden zur Klassifizierung der Hyperlipoproteinämien mit Hilfe der Elektrophorese beruhen auf der semiquantitativen Beurteilung der Lipoproteinkonzentrationen in den verschiedenen Fraktionen nach Anfärbung der Lipoproteine mit Sudanschwarz B, mit Oil-Red O oder mit dem Schiff's-Reagenz. Diese Bestimmung der relativen Konzentrationen ist aber ungenügend wegen der unterschiedlichen Farbstoff-Bindungs-kapazitäten der einzelnen Proteinkomponenten und der Variationen mit den Änderungen in der jeweiligen Struktur oder der chemischen Zusammensetzung der Lipoproteine. Eine genaue Korrelation zwischen der Lipoprotein-Konzentration und der Farbintensität ist also nicht gegeben, da die Farbstoffaufnahme anscheinend abhängig ist von der Lipidzusammensetzung der Lipoproteine (2).

Aus diesem Grunde soll jetzt versucht werden, in den mit der Stufengradienten-Gelelektrophorese getrennten Fraktionen direkt Cholesterin und Triglyceride zu bestimmen.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Die Klassifizierung der Hyperlipoproteinämien wurde auf der Grundlage der papierelektrophoretischen Trennung und Quantifizierung der Serumlipoproteine vorgenommen. Die Kriterien für die Typisierung waren deshalb in erster Linie auf den qualitativen und empirischen Trennergebnissen der verschiedenen Serumlipoproteinklassen aufgebaut, die sich unter den Bedingungen der Papierelektrophorese ergaben. Elektrophoretische Trennungen auf Agarose-Gel und Celluloseacetat zeigten verbesserte Ergebnisse bei der Trennung der vier Lipoproteinklassen im Serum.

Mit allen zur Zeit möglichen Variationen der Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist in den hier vorliegenden Untersuchungen der Versuch unternommen worden, eine optimale, reproduzierbare und für die Routinediagnostik geeignete Methode zu erarbeiten, mit deren Hilfe eine qualitative Beurteilung der Serumlipoproteinfraktionen von Normalpersonen und Personen mit den verschiedensten Hyperlipoproteinämieformen möglich ist. Die von uns ausgearbeitete Stufengradienten-Gelelektrophorese scheint diesen Zweck zu erfüllen; sie ist nach unserer Meinung allen anderen bisher üblichen elektrophoretischen Trennmethoden überlegen.

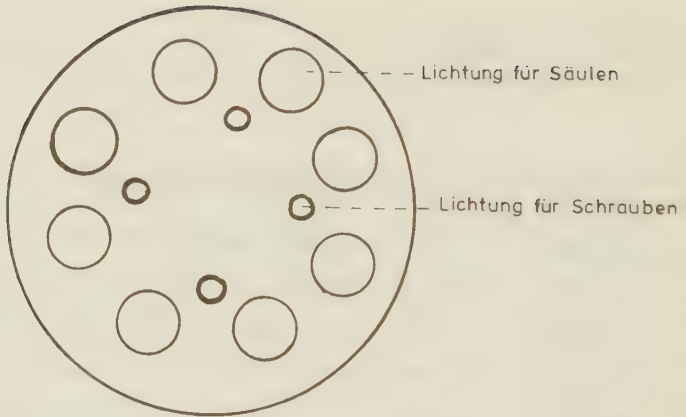
VIII. ABBILDUNGEN

Abbildung 1 Elektrophoresekammer

Abbildung 2 Gelröhrchen

Aufsicht

Abb. 1



Seitenansicht

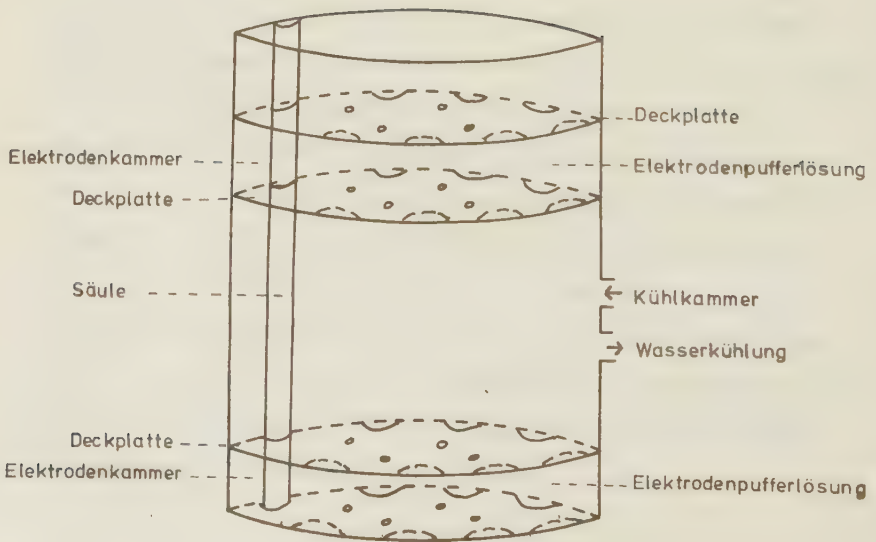
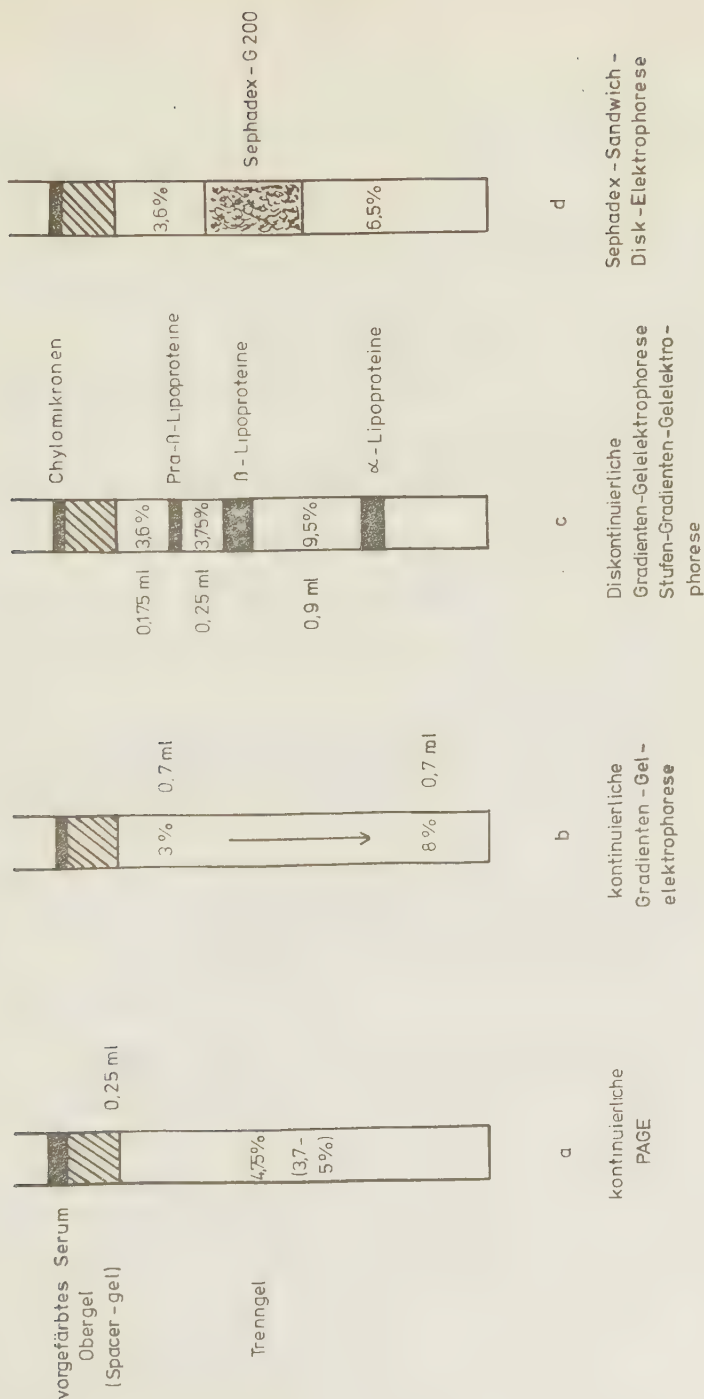


Abb. 2



IX. LITERATURÜBERSICHT

1. Chin, H.P. und Blauhushorn, D.H.
Clin.Chim.Acta 20, 365 (1968)
2. Cornwell, D.G. und Kruger, F.A.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 107, 296 (1961)
3. DeLalla, O.F. und Gofman, J.W.
Methods Biochem.Anal. 1, 459 (1954)
4. Ewing, A.M., Freeman, N.K. und Lindgren, F.F.
Advan.Lipid.Res. 3, 25 (1965)
5. Fredrickson, D.S., Levy, R.I. und Lees, R.S.
New Engl.J.Med. 276, 32-44, 94-103, 148-156, 215-226, 273-281
(1967)
6. Gofman, J.W. und Tandy, R.
In: Atherosclerotic Vascular Disease, ed. A.N.Brest und
J.H.Mayer, III. New York, p. 162 (1967)
7. Grassmann, W., Hannig, K.
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 290, 1 (1952)
8. Hatch, F.T. und Lees, R.S.
Advan.Lipid.Res. 6, 2 (1968).
9. Havel, R.J., Eder, H.A. und Bragdon, J.H.
J.Clin.Invest. 34, 1345 (1955)

10. Houtsmüller, A.J., Huysson-Haasdijk, A., Huysmann, A.
und Rinkel-Van Driel, E.
Clin.Chim.Acta 9, 497 (1964)
11. Koppikar, S.V., Fatterpaker, P. und Sreenivasan, A.
Analytical Biochemistry 33, 366-373 (1970)
12. Lees, R.S. und Hatch, F.F.
J.Lab.Clin.Med. 61, 518-528 (1963)
13. Lever, W.F., Gard, F.R.N., Uroma, E., Brown, R.K.,
Barnes, B.A., Schmid, K. und Schultz, E.L.
J.Clin.Invest. 30, 99 (1951)
14. Levy, R.I., Lees, R.S. und Fredrickson, D.S.
J.Clin.Invest. 45, 63 (1963)
15. Maurer, H.R.
Disc Electrophoresis and Related Techniques of Poly-
acrylamide Gel Electrophoresis
Walter de Gruyter, Berlin - New York, 224 Seite
16. Narayan, K.A., Narayan, S. und Kumerow, F.A.
Nature (London) 205, 246 (1965)
17. Narayan, K.A., Greinhin, H.L. und Kumerow, F.A.
J.Lipid.Res. 7, 150 (1966)
18. Narayan, K.A., Dudacek, W.E. und Kumerow, F.A.
Biochim.Biophys.Acta 125, 581 (1966)
19. Nichols, A.V.
Proc.Natl.Acad.Sciences 64, 1128 (1969)

20. Ockner, R.K. und Jones, A.L.
J.Lipid Res. 11, 284 (1970)
21. Oncley, J.L., Melin, M., Richerz, D.A., Cameron, J.W.
und Gross Jr. P.H.
J.Am.Chem.Soc. 71, 541 (1949)
22. Ornstein, L.
Ann.N.Y. Acad.Sci. 121, 321 (1964)
23. Raymond, A., Miles, J.L. und Lee, J.C.
Science 151, 346 (1966)
24. Ressler, N., Springgate, R. und Kaufman, J.
J.Chromatographie 6, 409 (1961)
25. Seidel, D., Alanpovic, P. und Furmann, H.R.
J.Clin.Invest. 48, 1211 (1969)
26. Wilcox, H.G. und Heimberg, M.
J.Lipid Res. 11, 7 (1970)
27. Zöllner, N., Gröbner, W., Berger, Ch. und Wolfram, G.
Z.klin.Chem u. klin.Biochem. 7, 525 (1969)

X. LEBENS LAUF

Ich, Michael Beltle wurde am 7.10.1946 als Sohn von Frau Ursula Beltle, geb. Fuß, und Dr. Josef Beltle geboren. Am 1.9.1953 trat ich in die Volksschule in Ruhpolding ein. Nach deren vierjährigem Besuch trat ich am 1.9.1957 in das Humanistische Gymnasium in Traunstein ein. Nach neun Jahren legte ich dort am 19.7.1966 meine Reifeprüfung mit Erfolg ab. Nach zweimonatigem Krankenpflegepraktikum begann ich am 1.11.1966 mit dem Studium der Humanmedizin an der Universität München. Nach zwei Semestern legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung, nach weiteren drei Semestern die ärztliche Vorprüfung ab. Am 4.8.1972 bestand ich die ärztliche Prüfung mit Erfolg.

